

Prof. zw. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak

Pracownia Wirusologii Molekularnej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

OCENA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Kosańskiej

Analiza zróżnicowania genetycznego wirusa HPV w populacji kobiet w województwie lubuskim,

wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Katarzyny Baldy-Chudzik, prof. UZ w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego w Zielonej Górze.

Ludzki wirus brodawczaka HPV (ang. *Human Papilloma Virus*) jest jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój raka szyjki macicy, piersi, sromu, odbytu oraz nowotworów głowy i szyi. Dotychczas zidentyfikowano przeszło 220 różnych typów tego wirusa, które ogólnie można podzielić na dwie grupy:

- o niskim potencjale onkogennym (jak np. HPV 6, HPV11)
- i wysokim potencjale onkogennym (np. HPV 16, HPV 18).

Za właściwe czynniki onkogenne wirusów odpowiedzialne są białka wczesne E6, E7 i E5 wirusa, zdolne do oddziaływania z licznymi czynnikami komórkowymi, biorącymi udział w kontroli i regulacji cyklu komórkowego. Do niekontrolowanej syntezy tych białek dochodzi w wyniku integracji genomu wirusa do genomu komórkowego w miejscu kodującym wirusowe białko regulatorowe E2. Mechanizm molekularny tego procesu nie został jednak do końca poznany. HPV 16 jest najczęściej występującym typem wirusa HPV w raku szyjki macicy. Znane są różne jego warianty, które różni się także potencjałem onkogennym.

Zakażenie wirusem HPV komórek nabłonkowych i skóry człowieka w populacji notuje się stosunkowo często, jednak do rozwoju nowotworów dochodzi u niewielkiej grupy osób i to najczęściej w wyniku długo trwającego zakażenia. Czynniki współdziałające z wirusem w procesie kancerogenezy nie zostały do końca poznane. Niewiele istnieje danych w literaturze przedmiotu odnośnie koinfekcji różnymi typami i wariantami wirusów HPV oraz ich wpływu na proces rozwoju kancerogenezy. Nieustannie poszukiwane są również czynniki, które stanowiłyby swoiste markery, pomocne w ocenie stopnia ryzyka wystąpienia zakażenia i rozwoju procesu nowotworowego. Z uwagi na to, cel badania wytyczony przez mgr Aleksandrę Kosańską uważam za właściwy i uzasadniony.

Doktorantka postanowiła zanalizować zakażenie ludzkim wirusem brodawczaka - różnymi jego typami - w złuszczonej komórce nabłonka szyjki macicy kobiet z

regionu lubuskiego, określi ich genotypy oraz form (episomalną i zintegrowaną). Ponadto, zdecydowała u najczęściej występujących typów wirusów onkogennych zanalizowała polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) w rejonie sekwencji kodującej białka E6 i E7 wirusa oraz ich związek ze stanem fizycznym wirusowego genomu, jak również obrazem cytologicznym.

Materiał badawczy stanowiły złoszczone komórki z szyjki macicy, pobrane od 458 kobiet z regionu lubuskiego, leczonych w Poradni Ginekologicznej i Klinicznego Oddziału Polonichno-Ginekologicznego Szpitala im. Karola Marcinkowskiego w Zielonej Górze.

Poszczególne próby poddano analizie cytologicznej oraz izolowano DNA. Obecność wirusowego DNA identyfikowano z zastosowaniem reakcji PCR oraz starterów uniwersalnych MY-09/11, umożliwiając wykrycie najczęściej występujących typów wirusa HPV. Próby HPV pozytywne poddano analizie PCR-RFLP, pozwalającej na identyfikację 49 typów wirusa HPV. Doktorantka określiła także liczbę kopii wirusa występujących w formie episomalnej i zintegrowanej, stosując technikę PCR, oraz oznaczyła polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) w rejonach kodujących białka wirusowe E6 i E7.

Stosowane metody analizy uważamy za właściwe odnośnie do wytyczonych na wstępie pracy celów badawczych. Wyniki przeprowadzonych badań Doktorantka przedstawiła na, załączonych w pracy, fotografiach i wykresach. DNA wirusów HPV zidentyfikowała w 20,3% badanych próbach. Jeden typ wirusa występował w 15,15% badanych próbach, natomiast 5,2% było zakażone dwoma lub trzema typami wirusa. Próby HPV dodatkowo pochodziły od kobiet z nieprawidłowym obrazem cytologicznym w szyjce. Wirusowe DNA zidentyfikowano także w 6% próbach pobranych od kobiet z prawidłowym wynikiem cytologicznym. W badanych próbach zidentyfikowano DNA 24 typów wirusa o różnych właściwościach onkogennych. Najczęściej zidentyfikowano DNA wirusa HPV 16 (7,4% próbach), HPV 31 (3,3%) oraz HPV 53 (2,4%). W próbach zakażonych kilkoma typami wirusa HPV wykrywano DNA wirusów zaliczanych do gatunku alfa 9 i alfa 6. Wirusy o dużym potencjale onkogennym zidentyfikowano przede wszystkim w próbach pobranych od kobiet młodszych, poniżej 35. roku życia. Wirusowy DNA HPV 16 występował w formie zintegrowanej z genomem komórkowym (w przeszło 60% próbach), natomiast HPV 31 - w formie episomalnej. Integrację DNA wirusa HPV 16 do genomu komórkowego Doktorantka najczęściej obserwowała w próbach zakażonych kilkoma typami wirusa HPV. Na podstawie wyników uzyskanych przez mgr Aleksandra Kosańskiego trudno udzielić odpowiedzi, jaki ma to wpływ na rozwój procesu nowotworowego i należałoby wyjaśnić to podczas dalszych badań.

Integracja wirusowego DNA jest jednym z czynników prowadzących do rozwoju nowotworu szyjki macicy związanej z niekontrolowaną ekspresją wirusowych białek onkogennych. Istnieje niewiele danych dotyczących struktury tych białek i ich wpływu na właściwości onkogenne. Z tego względu za interesujące uważamy wyniki badań Doktorantki nad polimorfizmem sekwencji nukleotydowych (SNP) w genach białek E6 i E7 wirusów o wysokim potencjale onkogennym, najczęściej zidentyfikowanych w badanych próbach (HPV 16 i HPV 31).

Doktorantka w rejonie kodującym wirusowe białko E6 HPV 16 stwierdziła występowanie siedmiu zmian SNP, w tym czterech stanowiących zmiany niesynonimiczne, prowadzące do substytucji aminokwasów K18T, L19V, I34M, L90V oraz T350G, występujących najczęściej w przeszło 60 badanych próbach. Jedną zmianę niesynonimiczną mgr Aleksandra Kosańska zidentyfikowała w rejonie kodującym białko E7 HPV 16.

Zmiana T350G została wcześniej opisana w literaturze przedmiotu, jednak jej związek z rozwojem nowotworu nie jest poznany. Wyniki badań Doktorantki wskazują, że zmiana ta może być dodatkowym markerem rozwoju nowotworu w komórkach zakażonych HPV, co wymagałoby jednak potwierdzenia w toku dalszych badań. Polimorfizm pojedynczych

nukleotydów Doktorantka stwierdziła także w rejonie sekwencji kodującej E6 i E7 wirusa HPV 31. W rejonie sekwencji kodującej E6 HPV 31 zidentyfikowała 9 miejsc polimorficznych, w tym cztery niesynonimiczne (H60Y, T64A, K123R, A138V), natomiast sześć miejsc polimorficznych w E7, w tym trzy prowadzące do substytucji aminokwasów (H23Y, E46K, K62E).

Jedną z zmian synonimicznych C721T Doktorantka stwierdziła po raz pierwszy. Uzyskane wyniki badań nad SNP w rejonach kodujących białka E6 i E7 wirusa HPV uważam za interesujące i ważne dla lepszego poznania molekularnego mechanizmu nowotworzenia. Wyniki te stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych badań. W mojej opinii interesujące byłoby także poznanie jak niektóre z SNP wpływają na aktywność białek E6 i E7.

Analizując wyniki badań Doktorantki, stwierdzam, że cele badań wytyczone na wstępie rozprawy zostały w pełni zrealizowane, a otrzymane przez mgr Aleksandrę Kosańską wyniki wnoszą nowe dane odnośnie zachorowań kobiet różnymi typami wirusa HPV w Polsce oraz mogą być pomocne przy opracowaniu swoistych markerów kancerogenezy HPV zależnej.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Kosańskiej została zaprezentowana w formie 149-stronicowego wydruku komputerowego, w układzie typowym dla tego typu rozpraw. Człowiekowi do wiadomości pracy poprzedza 46-stronicowy wstęp, w którym Doktorantka przedstawia biologię wirusów HPV, ich klasyfikację, organizację genomu, cykl życiowy wirusów oraz molekularny mechanizm kancerogenezy z udziałem wirusa HPV, profilaktykę zachorowań HPV. Rozdział ten napisany został na podstawie najnowszej literatury przedmiotu i odpowiednio wprowadza czytelnika w tematykę prowadzonych badań.

Cel badań jest przedstawiony w rozdziale 2. Do ich realizacji Doktorantka wykorzystowała najnowsze metody biologii molekularnej, które są dokładnie opisane w rozdziale 3, zatytułowanym „Materiały i metody”. Cele badań były konsekwentnie realizowane, a uzyskane wyniki przedstawione w rozdziale 4, bogato ilustrowanym 12 rycinami oraz zestawione w 18 tabelach, jak również w Aneksie. Uzyskane wyniki zostały także poddane analizie statystycznej, a ich dokumentacja jest bardzo starannie zaprezentowana.

Wyniki badań własnych mgr Aleksandry Kosańskiej dyskutuje z danymi z literatury przedmiotu w rozdziale 5, zatytułowanym „Dyskusja”. Rozdział ten wskazuje na dobrą znajomość Doktorantki najnowszej literatury przedmiotu i zrozumienie badanych zagadnień. Kolejne rozdziały rozprawy stanowią „Wnioski”, streszczenia w języku polskim i angielskim, „Spis rycin i tabel” oraz bogata „Bibliografia”, obejmująca 170 pozycji literatury przedmiotu.

Praca mgr Aleksandry Kosańskiej uważam za interesującą, napisaną w sposób jasny i zrozumiały. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych niejasności i błędów uproszczeń, jak na przykład:

„ryzyko rozwoju zmian nowotworowych wydaje się być związane także z pochodzeniem człowieka” (s. 14),

„Typy LR ekspresjonują dwa rodzaje białka E5” (s. 16),

„utworzenie aktywnych heksametrów białka E1” (s. 21),

„episomalne białka ekspresyjne” (s. 27),

„u kobiet z normalnym wynikiem cytologicznym” (s. 41), raczej prawidłowym,

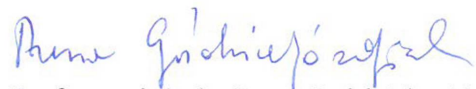
„skład reakcji trawienia restrykcyjnego” (s. 53).

Niezrozumiałe jest stwierdzenie „pozytywna zależność między wielkością ładunku wirusowego a stopniem zaawansowania zmian neoplastycznych” (s. 95), czy „Obserwowane rozbieżności na poziomie wirusii między typami HPV 16 i HPV 31” (s. 95).

Drobne uchybienia nie wpływają jednak na moją wysoką ocenę merytoryczną rozprawy.

Analizując wyniki badań Doktorantki, ich zakres, jak również znaczenie dla nauki, diagnostyki i profilaktyki zakażeń HPV, stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Aleksandry Kosańskiej spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DzU z 2017 r., poz. 1789).

Zatem, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego w Zielonej Górze o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Kosańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. zw. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak